

09/869185  
PCT/JPEC/67491

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

26.10.00

REC'D 15 DEC 2000

W/DO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年10月26日

JPO07491.

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第304185号

EU.

出願人  
Applicant(s):

サントリー株式会社

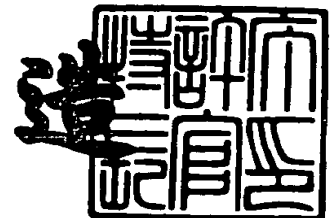
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3099153

【書類名】 特許願

【整理番号】 991618

【提出日】 平成11年10月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社基礎研究所内

【氏名】 芦刈 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー  
株式会社基礎研究所内

【氏名】 落合 美佐

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100091638

【弁理士】

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵母の育種方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (1) 選択マーカー遺伝子、
  - (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、
  - (3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び
  - (4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片、
- からなる DNA 構成物であって、該 FRT 配列が次の配列：

【化 1】

5' - GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC - 3' (配列番号：1)

逆向き反復	スパーサー	逆向き反復
配列 (1)	配列	配列 (2)

を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スパーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失していることを特徴とする DNA 構成物。

【請求項 2】 酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、その近傍にある FRT 配列の間に、目的遺伝子が挿入されている、請求項 1 に記載の DNA 構成物。

【請求項 3】 サッカロマイセス属酵母の形質転換方法において、

- (1) 請求項 1 記載の DNA 構成物を酵母細胞に導入し、該 DNA 構成物に存在する、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、酵母染色体 DNA との間の組換えにより、該 DNA 構成物を酵母染色体に組み込み、
- (2) 該 DNA 構成物に含まれている選択マーカー遺伝子の発現により、該 DNA 構成物が導入された酵母細胞を選択し、
- (3) 非選択培地で培養し、該 DNA 構成物に含まれる 1 対の FRT 配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、
- (4) ガラクトースを含む培地で培養し、増殖可能な酵母細胞を選択する、

ことを特徴とするサッカロマイセス属酵母の形質転換方法。

【請求項4】酵母染色体DNAとの間で組換え可能なDNA断片と、その近傍にあるFRT配列との間に目的遺伝子が挿入されているDNA構成物を用い、該目的遺伝子を酵母染色体に挿入することを特徴とする、請求項3記載のサッカロマイセス属酵母の形質転換方法。

【請求項5】請求項4記載の方法を複数回行うことにより、複数の目的遺伝子を導入することを特徴とする、請求項4記載のサッカロマイセス属酵母の形質転換方法。

【請求項6】請求項3～5のいずれかに記載の方法によって形質転換されたサッカロマイセス属酵母。

【請求項7】請求項6記載のサッカロマイセス属酵母を用いることを特徴とするビールの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、酵母の部位特異的組換えを用いて、選択マーカー遺伝子が欠失した形質転換体を作製する方法に関する。この方法を利用することにより、目的とする遺伝子を酵母に導入した後に、選択マーカー遺伝子を有さず、かつ好ましい形質を導入した酵母の形質転換体を得ることができる。本発明の形質転換方法によって得られた酵母は、サッカロマイセス属酵母を利用する酒類製造やパン製造、特にビール製造に使用することができる。

【0002】

【従来の技術】

酵母においては、現在までに多くの遺伝子導入方法が報告されているが、遺伝子導入効率が低いため、それらのいずれの方法においても形質転換体を選択するためには選択マーカーが必要である。選択マーカーとしては栄養要求性の回復などがあるが、酵母への栄養要求性の付与は困難である場合が多いため、一般的には抗生物質などの薬剤に対する耐性遺伝子が用いられている。しかしながら、酵母で効率よく利用できる薬剤耐性遺伝子の種類が少ないことから同一株を繰り返

し形質転換するためには選択マーカー遺伝子を取り除き再利用を行うことが望まれる。また、組換え体の実用化における安全性の面などからも、形質転換体から選択マーカー遺伝子を取り除くことが望ましい。

#### 【0003】

これらの問題を解決するために形質転換体から選択マーカー遺伝子を除く方法が開発されている。部位特異的な組換えを利用した方法がその一つである。

部位特異的な組換えは、組換えを行う酵素がその酵素が認識する特異的な塩基配列である2個の認識配列に作用し、該認識配列間で組換えを引き起こすことにより起こる。これらの組換えは1対の認識配列の配置により、欠失、挿入、逆位等の現象を引き起こす。部位特異的な組換えとしてバクテリオファージP1由来のCre/lox、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のFLP/FRT、醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来のR/RS、そして、バクテリオファージMu由来のGin/gixの4つが知られている（それぞれは組換えを行う酵素とその酵素が認識する特異的な塩基配列の組合せで示してある）。

#### 【0004】

出芽酵母は細胞中に2 $\mu$ mプラスミドと呼ばれる環状2本鎖DNAを持つことが知られており、2 $\mu$ mプラスミドには部位特異的な組換え機構が存在することが明らかになっている (Broach, J.R., Guarascio, V.R. and Jayaram, M., Cell, 29, 227-234, 1982)。2 $\mu$ mプラスミドは6318bpからなる環状プラスミドで、分子中に599bpからなる1対の逆向き反復配列を持ち、この逆向き反復配列間で部位特異的な組換えをおこすことが知られている。この逆向き反復配列間での組換え部位は、8bpのスペーサー配列と、それを挟む13bpの1つのミスマッチを含む短い逆向き反復配列から構成され (FRT配列)、さらに片側には1個の13bpの反復配列が続く。部位特異的な組換えは、プラスミド自身にコードされたFLP遺伝子より発現される組換え酵素 (Flp蛋白質) が、逆向き反復配列内の組換え部位に存在する特異的な塩基配列であるFRT配列に作用することによって起こる。

#### 【0005】

なお、FRT配列としては、8bpのスペーサー配列と13bpの逆向き反復配列からなる34bpの配列が知られている (J.F.Senecoff, R.C.Bruckner, and M.M.Cox, Pro

c.Natl.Acad.Sci.USA, 82, 7270-7274, 1985)。しかしながら、34bpのFRT配列を用いて部位特異的組換えを行うと、組換え後に染色体上に組換え酵素の認識配列が残り、目的としない組換えを誘導する可能性があることから実用的ではない。

#### 【0006】

そこで、組換え後に染色体上に残る認識配列間での組換えを抑える必要があった。

組換え酵素とその酵素の認識配列による部位特異的な組換えを用いた選択マーカー遺伝子の切り出しについてはいくつか報告されており、たとえば、出芽酵母でFLP/FRTの系を利用した選択マーカー遺伝子の切り出しが報告されている (F.S torici, M.Cogliervina and C.V.Bruschi, Yeast, 15, 271-283, 1999)。Storic iらは、kanMX4遺伝子またはURA3KI遺伝子を選択マーカー遺伝子とし、2(mプラスミドをもつCir<sup>+</sup>株の場合には、同方向に繰り返し配置したFRT配列の間に選択マーカー遺伝子を、一方2(mプラスミドをもたないCir<sup>0</sup>株の場合には同様に配置したFRT配列の間に選択マーカー遺伝子と共にFLP遺伝子を組み込み出芽酵母を形質転換した。得られた形質転換株を非選択培地で培養することによりFRT配列間での組換えを引き起こし、選択マーカー遺伝子を除去することに成功した。彼らは、FRT配列のコアの部分(8bpのスペーサー配列部分)に塩基置換を導入すると、同じ塩基置換を持つものどうしの組換えは起こるが別の塩基置換を持つものとの組換えは抑えられることを利用し、繰り返し形質転換と選択マーカー遺伝子の切り出しを行う際には、そのたびごとに別の塩基置換をもつFRT配列を利用することにより、染色体上に残るFRT配列間での目的としない組換えを抑えた。しかしながら、彼らの方法では、選択マーカー遺伝子の切り出し効率は0.01%-1.39%と非常に低く、選択マーカー遺伝子が除去された株を選択するのは容易ではない。さらに、FRT配列のコアの部分の塩基置換も数が限られており、何回も利用できるわけではない。

#### 【0007】

また、出芽酵母で、醤油酵母由来の部位特異的組換えの系であるR/RS系を利用した方法が開発されている(特開平10-66587号公報)。同公報によると、同方

向に繰り返し配置したRS配列の間に選択マーカー遺伝子およびガラクトースにより誘導できるプロモーターに連結したR遺伝子を組み込み出芽酵母を形質転換した。その際、R遺伝子と選択マーカー遺伝子とを挟む1対のRS配列をそれぞれ外側から数塩基欠失させることにより、組換え後に残るRS配列による目的としない組換えを抑えた。しかしながら、この方法では、外来の組換え酵素の遺伝子(R遺伝子)を導入する必要があった。また、形質転換する酵母の株の違いによって選択マーカー遺伝子の切り出し効率にバラツキがあり、特に実用株である醸造用酵母や野生型酵母では選択マーカー遺伝子の切り出し効率が低いため選択マーカー遺伝子が除去された株を選択するのは容易ではない。

## 【0008】

一方、出芽酵母では高発現させると細胞の増殖を阻害する配列(増殖阻害配列)があることが報告されている。こうした配列を利用した選択マーカー遺伝子の切り出しは既に報告されている(M. Kawahata et. al., Yeast 15, 1-10, 1999)。Kawahataらは、同方向に繰り返し配置した大腸菌由来の約1.2kbのhisG間に、URA3遺伝子と、ガラクトースで誘導可能なプロモーターに増殖阻害配列を連結し形質転換に用いた。染色体に挿入後、ガラクトースを含む培地で培養することにより、96%以上の効率で選択マーカー遺伝子を除去することに成功した。しかしながら、選択マーカー遺伝子の切り出しには相同組換えを利用しているため、染色体上に選択マーカー遺伝子の切り出し痕として残る不必要な配列が長く実用的でない。

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らは、選択マーカー遺伝子を欠失し、かつ望ましい目的遺伝子を効率よく発現する形質転換体を作製する方法を提供することを課題とした。また、このようにして作製された形質転換酵母の酒類製造やパン製造、特にビール製造への利用を検討することも本発明の課題である。

## 【0010】

## 【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明者らは、FRT配列と増殖阻害配列を組み合



わせることにより、選択マーカー遺伝子を欠失した酵母の形質転換体を作製する方法を見出した。

【0011】

具体的には、本発明は、

- (1) 選択マーカー遺伝子、
  - (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、
  - (3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び
  - (4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片、
- からなる DNA 構成物であって、該 FRT 配列が次の配列：

【0012】

【化 2】

5' - GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGACTTC - 3' (配列番号：1)

逆向き反復      スペーサー      逆向き反復

配列 (1)      配列      配列 (2)

【0013】

を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失していることを特徴とする DNA 構成物を提供する。

【0014】

また、本発明は、

- (1) 前記 DNA 構成物を酵母細胞に導入し、該 DNA 構成物に存在する、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、酵母染色体 DNA との間の組換えにより、該 DNA 構成物を酵母染色体に組み込み、
- (2) 該 DNA 構成物に含まれている選択マーカー遺伝子の発現により、該 DNA 構成物が導入された酵母細胞を選択し、
- (3) 非選択培地で培養し、該 DNA 構成物に含まれる 1 対の FRT 配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、

(4) ガラクトースを含む培地で培養し、増殖可能な酵母細胞を選択する、ことを特徴とするサッカロマイセス属酵母の形質転換方法を提供する。

【0015】

また、本発明は、前記形質転換方法を用いることにより得られたサッカロマイセス属酵母を提供する。

さらに本発明は、前記サッカロマイセス属酵母を用いることを特徴とするビールの製造方法を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明のDNA構成物、及びこれを用いるサッカロマイセス属酵母の形質転換方法の概略を図6に示す。図6に示すように、本発明のDNA構成物においては、

- (1) 選択マーカー遺伝子、
- (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、
- (3) (1)と(2)とを挟む同方向に配置された1対のFRT配列、及び
- (4) (3)の両側に配置される酵母染色体DNAとの間で組換え可能なDNA断片、からなる。

【0017】

本発明のDNA構成物中のFRT配列は次の配列：

【0018】

【化3】

5' -GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAGTTC- 3' (配列番号：1)

逆向き反復      スペーサー      逆向き反復

配列(1)      配列      配列(2)

【0019】

を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該1対のFRT配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも1個以上、6個以下の塩基が欠失している。欠失している塩基の数は1対のFRT配列のそれぞれで同じであっても異なってもよい。

## 【0020】

すなわち、1対のFRT配列のうちの、図6におけるFRT配列(a)は、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の1個以上、6個以下の塩基が欠失している。

## 【0021】

また、他方のFRT配列は（図6におけるFRT配列(b)）は、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の1個以上、6個以下の塩基が欠失している。

## 【0022】

本発明のDNA構成物中のFRT配列において、上記の意味における欠失することができる塩基数は、スペーサー配列に隣接する反復配列を構成する塩基（計13個）の内の1個以上、6個以下であり、好ましくは2個以上、5個以下であり、より好ましくは3個以上、5個以下である。塩基が6個より多く欠失すると、DNA組換えの可能性が極めて低くなり好ましくない。

## 【0023】

本発明で用いるFRT配列は、配列番号：1に示す配列を含んで成るが、その一方の側の逆向き反復配列において、上述したように短縮されている。しかしながら、短縮された逆向き反復配列とは反対側の逆向き反復配列では13個の塩基がそのまま維持されていることが望ましく、さらに反復配列が連結されて延長されていてもよい。天然のFRT配列においては、配列番号：1に示す配列の片側が、さらに1個の13bpの反復配列により延長された構造を有しており、本発明のFRT配列においても、前記のごとく短縮された逆向き反復配列の側とは反対の逆向き反復配列は、天然配列と同様に反復していてもよい。

## 【0024】

本発明で用いるFRT配列は、上に定義した配列を有するものの他に、それと実質的に同じ塩基配列を有するものも含まれる。ここで「実質的に同じ配列」とは、Flpタンパク質によって認識され、FRT配列間で組換えを起こすことができる配列であり、例えば上記に定義した配列に対して、1又は数個の塩基の置換、欠失又は付加により修飾されている塩基配列を意味する。

## 【 0 0 2 5 】

例えば本発明の一例であるDNA構成物の構造を示すpPUGINFRT3-103（図4）では、1対のFRT配列のうちの、図4におけるFRT3（配列番号：5）は、選択マーカ遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の5個の塩基が欠失しており、また選択マーカ遺伝子と増殖阻害配列に近位の側の逆向き反復配列は13個の塩基が維持されている。

## 【 0 0 2 6 】

なお、図4に示すpPUGINFRT3-103において、FRT3、FRT103の近くに記載している矢印はその方向性を示しており、具体的には、図4におけるFRT3は、図3におけるFRT3の3'側がPRA側にあり、図3における5'側がURA3側に挿入されている。また、図4におけるFRT103は、図3におけるFRT103の3'側がGIN11M86側にあり、図3における5'側がPRA-tail側に挿入されていることを示している。

## 【 0 0 2 7 】

また、他方のFRT配列は（図4におけるFRT103）（配列番号：6）は、選択マーカ遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の4個の塩基が欠失しており、また選択マーカ遺伝子と増殖阻害配列に近位の側の逆向き反復配列は13個の塩基が維持されている。

## 【 0 0 2 8 】

上記のごとき1対のFRT配列を有するDNA構成物に対して、酵母のもつ2（mプラスミド上のFLP遺伝子により発現される組換え酵素が作用すれば、DNAの組換えが生ずる。

## 【 0 0 2 9 】

その結果、選択マーカ遺伝子と増殖阻害配列が除去されると共に、一方のFRT配列（例えばFRT3）の短縮された側の部分と、他方のFRT配列（例えば、FRT103）の短縮された側の部分とが融合した配列が再構成される。この再構成された配列は、スペーサー配列の両端に短縮された逆向き反復配列を有しており、例えばFRT3配列とFRT103配列とからは、図3に示すFRT3W配列（配列番号：7）が生ずる。

## 【 0 0 3 0 】

下記の実施例で作製したDNA構成物に用いた1対のFRT配列とこれから組換えによって生じる再構成された配列を図3に例示する。このうち、1対のFRT配列がFRT2とFRT102の組合せ、及びFRT3とFRT103の組合せは本発明のDNA構成物に使用する好ましい1対のFRT配列である。しかし、FRT4及びFRT104はそれぞれ、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の7個の塩基が欠失しており、これを1対のFRT配列として用いたDNA構成物では組換え効率が低いことが判明した。

## 【0031】

実施例1に示すごとく、スペーサー配列を中心にして、一方の側の逆向き反復配列のみが短縮されたFRT配列は酵母のもつ2 (mプラスミド上のFLP遺伝子産物の作用によって組換えを生ずるが、両側の逆向き反復配列が短縮された場合（例えば、FRT3W配列）にはFLP遺伝子産物の作用による組換えが生じにくくなる。

## 【0032】

本発明のDNA構成物では、上記FRT配列とガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列とを組み合わせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、かつガラクトースを含む培地で増殖可能な酵母細胞を選択することが可能となる。

## 【0033】

本発明で用いるガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列とは、ガラクトースを含む培地で培養したときに細胞の増殖を阻害するRNA又は蛋白質をコードする配列をいう。例えば、本実施例において使用したGIN11は、サッカロマイセス酵母の細胞内に多コピー存在することにより、細胞の増殖を阻害するDNA断片の一つとして単離された (R. Akada et al., Mol. Gen. Genet. 254, 267-274, 1997)。GIN11以外にも、高発現させることにより細胞増殖を抑制あるいは阻害する遺伝子あるいはDNA配列を用いることも可能である。例えば、GIN4、URA2、BNI1、PSP1、BOI1、RBP1、SAC7、TPK3、PRK1 (R. Akada et al., Mol. Gen. Genet. 254, 267-274, 1997)、ACT1、ARF2、ATE1、AUA1、ERG6、HSF1、MCM1、NHP6A、NTH1、RH01、SEC17、SIR1、SRP40 (C. Espinet et al., Yeast, 11, 25-32, 1995) 等が使用できる。

## 【0034】

増殖阻害配列を本発明のDNA構成物に組み込むには、GAL1プロモーターなどの適当なプロモーターに連結して導入する。

選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列は1対のFRT配列に挟まれて存在するが、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列はどちらが上流側にあってもよい。

【0035】

また、選択マーカー遺伝子としては、酵母において使用される任意の選択マーカー遺伝子を用いることができ、例えばゲネチシン含有培地で選択可能なゲネチシン耐性遺伝子やその他にセルレニン耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子等の薬剤耐性選択マーカー遺伝子、あるいはURA3遺伝子、LEU2遺伝子、TRP1遺伝子、HIS4遺伝子等の栄養要求性に基づく選択マーカー遺伝子を使用することができる。後述する実施例に示すように、本発明においては、栄養要求性に基づく選択マーカー遺伝子であっても、薬剤耐性に基づく選択マーカー遺伝子であっても、本発明のDNA構成物に含まれる1対のFRT配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を効率よく切除することができた。

【0036】

酵母染色体DNAとの間で組換え可能なDNA断片は、酵母染色体上の遺伝子の一部分と相同性を有するDNA断片であり、酵母染色体上の遺伝子としては、その遺伝子が破壊されても酵母の増殖が阻害されない遺伝子であって、例えばプロテアーゼA遺伝子、リボソームDNA遺伝子、CYC7遺伝子等、が挙げられる。

【0037】

本発明では、酵母染色体DNAとの間で組換え可能なDNA断片と、その近傍にあるFRT配列の間に、目的遺伝子が挿入されていることが好ましい。

本発明のDNA構成物は当業者に公知の方法により作製することができ、具体的手法は例えばSambrookらのMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載のものを用いることができる。

【0038】

本発明はまた、上記のDNA構成物を用いる、サッカロマイセス属酵母の形質転換方法を提供する。この方法においては、

- (1) 前記DNA構成物を酵母細胞に導入し、該DNA構成物に存在する、酵母染色

体DNAとの間で組換え可能なDNA断片と、酵母染色体DNAとの間の組換えにより、該DNA構成物を酵母染色体に組み込み、

(2) 該DNA構成物に含まれている選択マーカー遺伝子の発現により、該DNA構成物が導入された酵母細胞を選択し、

(3) 非選択培地で培養し、該DNA構成物に含まれる1対のFRT配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、

(4) ガラクトースを含む培地で培養し、増殖可能な酵母細胞を選択する。

#### 【0039】

この形質転換操作は複数回反復することができ、これにより、下記に説明するように、同一の選択マーカー遺伝子を用いて複数の目的遺伝子を酵母の染色体に導入することができる。上記の方法において、DNA構成物はそれ自体からなる、もしくはそれ自体を含むDNA断片として、又は該DNA構成物が挿入されたプラスミドの形で酵母細胞中に導入することができる。この導入は、すでに知られている任意の方法、例えば酢酸リチウム法、塩化リチウム法、プロトプラスト法等により行うことができる。

#### 【0040】

サッカロマイセス属酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ、サッカロマイセス・カールスペンゲンシス、サッカロマイセス・バイアヌス、サッカロマイセス・パストリアヌス、サッカロマイセス・ディアスタチカス等が使用できる。

#### 【0041】

次いで形質転換体からDNA構成物に含まれている選択マーカー遺伝子を発現させることにより、該DNA構成物が導入された酵母細胞を選択する。次にこれを非選択培地、例えば完全栄養培地であるYPD培地（グルコース2%、ペプトン2%、酵母エキス2%）で培養すると、酵母細胞内FLP遺伝子の発現産物であるFlp組換え酵素の働きにより1対のFRT配列間において組換えを起こす細胞がある。一方、FRT配列間で組換えがおこらなかった細胞はガラクトースを含む培地で培養することにより増殖阻害配列の発現が誘導され増殖が阻害される。したがって、ガラクトースを含む培地で増殖できる細胞は染色体上に挿入されたFRT配列間で

組換えがおこり、その間に挿入されていた選択マーカー遺伝子および増殖阻害配列が除去されたものである。これによって、好ましい酵母形質転換体であって、かつ選択マーカー遺伝子が除去された酵母細胞を得ることができる。

#### 【0042】

本発明の方法では、同方向に配置したFRT配列の間に発現可能な選択マーカー遺伝子とガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列を配置したDNA構成物、例えばDNA断片、プラスミド、その他のベクター等を用いて形質転換を行うが、その際、前記のごとく定義される1対のFRT配列を用いることにより、組換え後に残存する配列がFLP遺伝子産物により認識されにくい配列になり、目的としない組換えを誘導する可能性が低減し、形質転換体から選択マーカー遺伝子を特異的に除去し、目的とする形質転換体を得ることができる（図7参照）。本発明では上述したように、FLP遺伝子は酵母自体の2（m）プラスミド上に存在するために、外来の組換え酵素の遺伝子を導入する必要がない。

#### 【0043】

本発明の方法を用いることにより、後代をとったり、再度の形質転換や交配などの操作を伴うことなく、選択マーカー遺伝子の除去が可能となった。また、選択マーカー遺伝子に関する安全性評価を省略することも可能になり、開発期間を短縮でき、開発コストも低減することができる。さらに、選択マーカー遺伝子が欠失した形質転換体を用いて、再び同じ選択マーカー遺伝子を用いた形質転換が可能となり、複数の遺伝子を繰り返し導入することも可能となる。本発明の方法は、例えば有用な蛋白質をコードする目的遺伝子を酵母の染色体に導入する場合に、次のようにして用いることができる。

#### 【0044】

本発明のDNA構成物においては、前記のごとく配置された1対のFRT配列を含んで成るDNA断片の両端に、1対のFRT配列を挟むように、酵母染色体DNAとの間で組換え可能なDNA断片（酵母染色体組換え領域と称する場合がある）が直接に又は間接に連結されている。FRT配列と右又は左ボーダーとが間接的に連結されている場合には、それらの間に酵母の染色体に組み込むべき目的とする遺伝子が挿入されている（図6を参照のこと）。このDNA構成物が酵母に導入されれば、こ



のDNA構成物の酵母染色体組換え領域と酵母の対応する染色体遺伝子との間で組換えが生じ、DNA構成物が全体として酵母染色体DNAに組み込まれる。

## 【0045】

次に、この酵母を培養すれば酵母自体の2(mプラスミド上のFLP遺伝子産物が生産され、これがFRT配列に作用して、1対のFRT配列間で前記のごとき部位特異的組換えが生じ、これら1対のFRT配列に挟まれた領域(選択マーカー遺伝子及び増殖阻害配列を含む領域)が除去され、組換えにより融合した(両端が短縮された)FRT配列と酵母染色体組換え領域との間の目的遺伝子が酵母染色体遺伝子に組み込まれたまま残る。そして、上記の両端が短縮されたFRT配列はもはや組換えを生じないから、挿入された目的遺伝子は酵母染色体中に安定に維持される。

## 【0046】

すなわち、本発明によれば、目的遺伝子が酵母染色体に挿入された後選択マーカー遺伝子(及び増殖阻害配列)が除去され、且つFRT配列が機能できなくなる。従って、目的遺伝子を1回導入した後、同じ選択マーカー遺伝子を含有する遺伝子導入用ベクター(本発明のDNA構成物)を用いて、さらなる目的遺伝子の導入を行うことができる。

## 【0047】

本発明はさらに、このような方法を用いて、目的遺伝子が安定に導入された酵母を用いることを特徴とする酒類、特にビールの製造方法を提供する。目的遺伝子としてはビールの品質や醸造工程を改良するための種々の遺伝子であってよい。

## 【0048】

例えば、ビール醸造では酵母の代謝により好ましくない香味(オフフレーバー)が生成される。それらの生成量は醸造用酵母の特定の遺伝子発現を調節することにより、低減もしくは消失させることが可能となる。例えば、ビールのオフフレーバーの例として硫化水素やVDK(ダイアセチルと2,3-ペンタジオン)が挙げられる。硫化水素は硫黄同化経路の中間代謝物であって、一般的なビール酵母を用いた場合はビール醸造中での発生を押さえることは困難である。ところが、遺

伝子組換技術を利用し、ビール酵母のMET25遺伝子を高発現させることにより、ビール醸造中の硫化水素の発生が抑えられることが報告されている（特開平7-303475号公報）。オフフレーバーのもう一つの例であるVDKは分枝アミノ酸合成経路の中間代謝物であり、この場合も遺伝子組換技術を利用して酵母のILV5遺伝子を高発現させることにより、VDKの発生が抑えられることが報告されている（S.M. Mithieux and A.S. Weiss, Yeast 11:311-316, 1995）。

#### 【0049】

上述したように、遺伝子組換技術を用いてオフフレーバーの生成を抑えた酵母の育種は文献上いくつか知られているが、実プラントを用いて商業生産に利用されているものは皆無である。このようにせっかく育種された有用酵母が商業生産で利用されない一因として遺伝子組換酵母のDNA中に存在する選択マーカー遺伝子や酵母以外の微生物に由来するDNA断片の存在がある。

#### 【0050】

本発明では、選択マーカー遺伝子やその他の不要なDNA配列の両端にFRT配列を挿入することにより、形質転換後には不要な配列を除去することが可能となる。その結果、選択マーカー遺伝子の再利用が可能となり、選択マーカー遺伝子の種類が少ないビール酵母に複数個の遺伝子が導入できるようになることから、ビール酵母の育種の幅が格段に広がる。例えば、先に別々の育種例として示したILV5遺伝子とMET25遺伝子を同じ酵母細胞に別々に入れることが可能になり、硫化水素とVDKの両方の生成を抑えた酵母の育種へとつながる。また、本発明により得られる形質転換ビール酵母はビール酵母以外のDNA配列を含まないことから、安全性の点で社会的受容も受けやすく、その結果、商業生産での利用が可能になる。

#### 【0051】

本発明がオフフレーバー除去の酵母育種だけでなく、醸造の効率化などの他の育種にも利用できることは明白である。例えば糖（Y. Kodama, J. Am. Soc. Brew. Chem. 53:24-29, 1995）やアミノ酸のトランスポーターを遺伝子組換により強化することにより、発酵速度の向上が可能であり、また、浸透圧やアルコールなどのストレスに対する抵抗性を遺伝子工学的に付与することにより、高濃度の

アルコールが製造できるようになることから効率的な醸造が可能になる。このような育種に本発明を利用することにより、オフフレーバー除去で記載したのと同じ効果が期待できる。

【0052】

本発明では、1倍体酵母のみならず、醸造用の2倍体酵母においても選択マーカー遺伝子の除去を効率よく行うことが確認され、実際のビール製造への利用が期待できる。

【0053】

【実施例】

以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、これらの実施例は例示を目的として提供されているだけであって、本発明の範囲を限定することを意図しているものではない。実験の手順は特に記述しない限り、SambrookらのMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

実施例 1 : FRT配列を利用した選択マーカー遺伝子の切り出し効率の検討

(1) 野生型FRT配列を含むプラスミドの構築

FRT配列をプラスミドに導入するために以下の4種類のオリゴヌクレオチドを合成した(下線部が野生型FRT配列)。

FRT1-a

5'-TCGACGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCG-3' (配列番号: 11)

FRT1-b

5'-AATTTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCG-3' (配列番号: 12)

FRT101-a

5'-AGCTTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGCATG-3' (配列番号: 13)

FRT101-b

5'-CGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCA-3' (配列番号: 14)

これらの合成DNAの末端をリン酸化したのち、FRT1-aとFRT1-b、FRT101-aとFRT101-bをそれぞれアニーリングし、前者をpUC18(東洋紡績株式会社)の制限酵素EcoRI-SphIサイトに、つづいて後者を制限酵素SphI-HindIIIサイトに挿入し、プ

ラスミド pFRT1-101 (図 1) を構築した。

【 0 0 5 4 】

選択マーカー遺伝子には、URA3 遺伝子を用いた。URA3 遺伝子をもつ株は  $Ura^+$  の形質で選択でき、一方 URA3 遺伝子の除去された  $ura3$  株は、5-フルオロオロチン酸耐性で選択が可能であり、 $ura3$  株を宿主とすれば、選択マーカー遺伝子 URA3 を有する株、除去された株ともに容易に判定できる。

【 0 0 5 5 】

別途、pUC18 を制限酵素 EcoRI 及び SphI で消化し、Blunting Kit (宝酒造 (株) 製) で末端を平滑化したのちセルフライゲーションを行うことにより連結し、pUC18HSp を構築した。この制限酵素 HindIII サイトに YEp24 (Botstein, D., et al., Gene, 8, 17, 1979) の URA3 遺伝子を含む 1.2kb の制限酵素 HindIII 断片を挿入し、pURA34 を構築した。(図 1)。

【 0 0 5 6 】

pFRT1-101 を制限酵素 SphI で消化後、Blunting Kit (宝酒造 (株) 製) で末端を平滑化したのち、pURA34 を制限酵素 HindIII で消化後 Blunting Kit (宝酒造 (株) 製) で末端を平滑化して得た約 1.2kb の断片と連結し、プラスミド pURA3FRT1-101 (図 1) を構築した。

【 0 0 5 7 】

pURA3FRT1-101 を制限酵素 EcoRI と HindIII で処理して得られる約 1.2kb の DNA 断片と pPRACer11 (図 1) を EcoRI と HindIII で処理して得られる約 4.2kb の断片を連結しプラスミド pPUFRT1-101 を構築した (図 1)。なお、pPRACer11 は、pBluescript  $SK^+$  (東洋紡 (株)) に、pHM153 から切り出した HindIII-SalI 断片 (J. Bacteriol., 172, 610-618, 1990) と、gap terminator と gap promoter (Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 129-133, 1989) に挟まれた Cer 耐性遺伝子 (PDR4 の約 1.7kb の DraI-KpnI 断片として得た : Gene, 101, 149-152, 1991) と、プロテアーゼ A 遺伝子 (PRA) としてプラスミド CBZ1 の SacI-EcoRI 断片及び HindIII-XhoI 断片 (Mol. Cell. Biol., 6, 2500-2510, 1986) とを挿入することによって構築した。

(2) 選択マーカー遺伝子から見て外側にあたる数塩基が野生型 FRT 配列と比較

し欠失したFRT配列を含むプラスミドの構築

次に、pPUFRT1-101の野生型FRTを、合成DNAにより作成された種々の長さのFRT配列に置き換えたプラスミドを作成する。用いた合成DNAの配列は以下に示す通りである。

FRT2-a : 5' -CTAGAGAATAGGAACG-3' (配列番号 : 1 5)

FRT2-b : 5' -AATTCGTTTCCTATTCT-3' (配列番号 : 1 6)

FRT102-a : 5' -AGCTTGTTTCCTATACTTT-3' (配列番号 : 1 7)

FRT102-b : 5' -CTAGAAAGTATAGGAACA-3' (配列番号 : 1 8)

FRT3-a : 5' -CTAGAGAATAGGAG-3' (配列番号 : 1 9)

FRT3-b : 5' -AATTCTCCTATTCT-3' (配列番号 : 2 0)

FRT103-a : 5' -AGCTTTCCTATACTTT-3' (配列番号 : 2 1)

FRT103-b : 5' -CTAGAAAGTATAGGAA-3' (配列番号 : 2 2)

FRT4-a : 5' -CTAGAGAATAGG-3' (配列番号 : 2 3)

FRT4-b : 5' -AATTCCTATTCT-3' (配列番号 : 2 4)

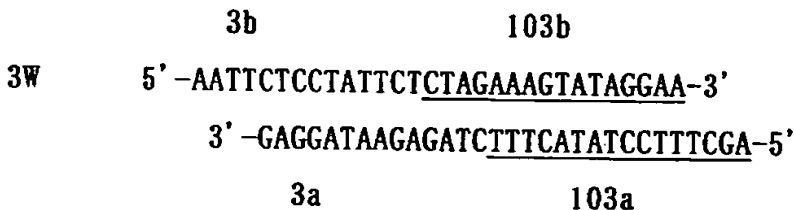
FRT104-a : 5' -AGCTTCTATACTTT-3 (配列番号 : 2 5)

FRT104-b : 5' -CTAGAAAGTATAGA-3' (配列番号 : 2 6)

上記の配列は合成DNAの5'末端をリン酸化したのち、FRT2-aとFRT2-bとFRT102-aとFRT102-b、FRT3-aとFRT3-bとFRT103-aとFRT103-b、FRT4-aとFRT4-bとFRT104-aとFRT104-bの組み合わせでアニーリングし、それぞれpUC18のEcoRI-HindIIIサイトに挿入し、プラスミドpFRT2w、pFRT3w (図2)、pFRT4wを構築した。なお、上記工程ではそれぞれ4種の合成DNAをアニーリングして、両端が欠失したW配列を作製してプラスミドに挿入したが、例えばFRT3-aとFRT3-bとFRT103-aとFRT103-bの組み合わせで得られるW配列を以下に示す。

【 0 0 5 8 】

## 【化 4】



## 【0 0 5 9】

これらプラスミド(pFRT2w、pFRT3w、pFRT4w)のXbaIサイトにプラスミドpURA3FRT1-101をXbaIで処理して得られる約1.2kbの断片をそれぞれ挿入し、プラスミドpURA3FRT2-102、pURA3FRT3-103(図2)、pURA3FRT4-104を構築した。これらのプラスミドは同じ向きに並べた1対のFRT配列の間に選択マーカー遺伝子URA3が配置されており、各々のFRT配列は、選択マーカー遺伝子から見て外側にあたる数残基が野生型FRT配列と比較し欠失したものである。

## 【0 0 6 0】

このようにして得られたFRT配列およびその組み合わせで切り出し後に生じるFRT配列を図3にまとめた。

これらのプラスミドをそれぞれEcoRIとHindIIIで処理して得られる約1.2kbの断片とpPRACer11をEcoRIとHindIIIで処理して得られる約4.2kbの断片を連結し、プラスミドpPUFRT2-102、pPUFRT3-103(図2)、pPUFRT4-104を構築した。

## (3) In vivoにおける組換え頻度の検討

一倍体酵母としてR27-7C-1C株(MAT $\alpha$  trp1 leu2 his3 ura3)を用いた。酵母の形質転換はリチウムクロライドを用いた方法(Kodama, Y., et al., J. Am. Soc. Brew. Chem., 53, 24-29, 1995)により行うことが可能である。

## 【0 0 6 1】

pPUFRT1-101、pPUFRT2-102、pPUFRT3-103、pPUFRT4-104、それぞれ約10 $\mu$ gをKpnIとSacIで処理し、エタノール沈殿後、10 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解してその全量を酵母の組換えに使用し、Ura<sup>+</sup>に形質転換した株を選択した。すなわち、Ura<sup>-</sup>選択培地(Yeast Nitrogen Base [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (DIFCO社)、グルコース2%、ロイシン0.01%、トリプトファン0.01%、寒天2%)に上記形質転換操作をした酵母

を塗布し、30℃で72時間インキュベートする。

【0062】

こうして得られた形質転換株をYPD液体培地で30℃で一晩培養し、R27-7C-1C株のもつ2 $\mu$ mプラスミド上のFLP遺伝子より発現される組換え酵素による、染色体上に導入した2個のFRT配列間での組換えを誘導した。

【0063】

培養液を無菌水で適当に希釈し、そのうち100 $\mu$ lをYPD寒天培地および5-フルオロオロチン酸を含む寒天培地 (Yeast Nitrogen Base [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (DIFCO社)、グルコース2%、ウラシル 0.005%、ロイシン0.01%、トリプトファン0.01%、5-フルオロオロチン酸0.1%、寒天2%) にそれぞれ塗布し、30℃で48時間培養したのち、出現したコロニーの数を数えた。5-フルオロオロチン酸を含む培地で増殖できる細胞が組換えが起こった細胞である。結果を表1に示した。

【0064】

【表1】

FRT 配列	組換え頻度
FRT1-FRT101 (野生型)	1/3 - 1/2
FRT2-FRT102	1/10 <sup>3</sup> - 1/10 <sup>4</sup>
FRT3-FRT103	1/10 <sup>5</sup> - 1/10 <sup>6</sup>
FRT4-FRT104	< 1/10 <sup>7</sup>

【0065】

表1に示す通り、in vivoにおける組換え効率は、野生型FRT配列の組み合わせでも1/2以下であり、欠失が多くなるにしたがってその頻度が急激に低下することが分かった。

実施例2： FRT配列とGIN11を組み合わせた選択マーカ－遺伝子の切り出し効率の検討

(1) プラスミドpPUGINFRT3-103の構築

GIN11を有するプラスミドを作製するために、2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

GIN-1 : 5' - TGGATCCGGAATTTGACGGATCAATAAC-3' (配列番号 : 27)

GIN-2 : 5'-TTCTGCAGACTAGATGCACTCATATCATTATGCAC-3' (配列番号 : 28)

これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、プラスミドpAUR135 (宝酒造 (株)) を鋳型としてPCRを行うことにより得られた約0.7kbの断片をBamHIとPstIで処理し、pHM999 (特開平10-66587号公報) をEcoRIとBamHIで処理して得られるGAL1プロモーターを含む約0.8kbの断片とともに、pUC19のEcoRI-PstIサイトに挿入することにより、GIN11M86 (宝酒造 (株) 製) をGAL1プロモーターに連結したプラスミドpPGAL1GIN (図4) を作製した。

#### 【0066】

これをEcoRIとPstIで処理して得られる約1.5kbの断片の末端をBlunting Kit (宝酒造 (株) 製) で平滑化したのち、pPUFRT3-103のSmaIサイトに挿入し、プラスミドpPUGINFRT3-103を得た。(図4)

#### (2) 研究室株を用いた選択マーカー遺伝子の除去

一倍体酵母としてR27-7C-1C株 (MAT $\alpha$  trp1 leu2 his3 ura3) を用いた。プラスミドpPUGINFRT3-103をKpnIとSacIで処理して得られる約4.1kbのDNA断片 (約10  $\mu$ g) を酵母の組換えに使用し、形質転換体のUra<sup>+</sup>の形質により選択した。

#### 【0067】

得られた形質転換体を非選択培地で培養すると細胞内にあるFlp組換え酵素の働きによってFRT配列間で組換えをおこす細胞がある。一方、FRT配列間で組換えがおこらなかった細胞はガラクトースを含む培地で培養することによりGIN11M86の発現が誘導され増殖が阻害される。したがって、ガラクトースを含む培地で増殖できる細胞は染色体上に挿入されたFRT配列間で組換えがおこり、その間に挿入されていた選択マーカー遺伝子およびGAL1プロモーターに連結されたGIN11M86が除去されたものである。

#### 【0068】

得られた形質転換体を10mlのYPGal (ペプトン2%、酵母エキス1%、ガラクトース2%) 液体培地にて30℃、24時間培養し、FRT配列間での組換えをおこすとともに、GIN11M86の発現を誘導した。培養液を適当に希釈し、YPGal寒天培地に塗付し30℃で48時間培養した。得られたコロニーのうち100株を5-フルオロオロチン酸寒天培地およびUra<sup>-</sup>選択寒天培地で30℃、48時間培養した。その結果、



すべての株がUra<sup>-</sup>選択寒天培地でのみ生育できなかった。つまり、YPGal寒天培地で生育できた株は、すべてURA3遺伝子が除去されたことを示している。

### 実施例3：薬剤耐性選択マーカー遺伝子の除去

#### (1) プラスミドpPPGINFRT3の構築

選択マーカー遺伝子としてPDR4（セルレニンおよびシクロヘキシミド耐性遺伝子）を用い、ガラクトースにより誘導されるGAL1プロモーターにつないだGIN1M86とともに部位特異的組換え配列（FRT3, FRT103）で挟んだ。プラスミドpPGAL1GINを制限酵素EcoRIで処理しBlunting Kit（宝酒造（株））で末端を平滑化したのち制限酵素PstIで処理して得られる約1.5kbの断片を、プラスミドpFRT1-101のHincII-PstIサイトに挿入し、プラスミドpFRT1GIN（図5）を構築した。pFRT1GINを制限酵素XbaIで処理して得られる約1.5kbの断片をpFRT3wのXbaIサイトに挿入し、プラスミドpFRT3-103-GINを得た（図5）。

【0069】

pPRACer11をSphIとSalIで処理して得られる約2.7kbの断片をpUC18のSphI-SalIサイトに挿入したあとSalIで処理し、Blunting Kitで末端を平滑化してpPstIリンカー（東洋紡績（株））を挿入しプラスミドpPGAPDHPDR4を構築した（図5）。pPGAPDHPDR4をSphIとPstIで処理して得られる約2.7kbの断片をpFRT3-103-GINのSphI-PstIサイトに挿入し、プラスミドpFRT3-103-GINPDR4を構築した（図5）。これをEcoRIとHindIIIで処理して得られる約4.2kbの断片とpPRACer11をEcoRIとHindIIIで処理して得られる約4.2kbの断片を連結し、プラスミドpPPGINFRT3（図5）を構築した。

【0070】

このプラスミドではFRT3とFRT103の間に、ガラクトースで誘導できるプロモーターに連結されたGIN11と、酵母の構成的なプロモーターの一つであるグリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素のプロモーターに連結されたPDR4遺伝子が挿入されている。

#### (2) 研究室株を用いた選択マーカー遺伝子の除去

プラスミドpPPGINFRT3約10 $\mu$ gを制限酵素KpnIとSacIで処理し、エタノール沈

殿後、10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解してその全量を形質転換に使用した。宿主として一倍体R27-7C-1C株を用い、リチュウムクロライドを用いた方法により形質転換した。その後、1  $\mu$ g/mlのシクロヘキシミドを含むYPDプレートに塗付し、30℃で2日間培養してシクロヘキシミド耐性株を選択した。

## 【0071】

選択マーカー遺伝子を切り出すためにYPGal液体培地10mlに形質転換株を1白金耳植菌し、30℃で24時間振とう培養した。適当に希釈したあとYPGalプレートに塗付し30℃で2日間培養した。得られたコロニーを任意に100株選択し、シクロヘキシミドを含むYPDプレートにレプリカしてシクロヘキシミド耐性を調べた。

## 【0072】

その結果、100株中100株がシクロヘキシミド感受性であり、これらの株では部位特異的組換えにより選択マーカー遺伝子が切り出されたと考えられる。

## (3) 醸造用酵母を用いた選択マーカー遺伝子の除去

## (3-1) 1回目の形質転換と選択マーカー遺伝子の除去

形質転換体の作出は研究室株を用いた場合と同じ方法で行った。宿主としては2倍体の野生型酵母AY-1株 (MAT a/(野生型))を用いたが、二倍以上の倍数を持つ酵母であればいずれの酵母を用いても良い。

## 【0073】

得られた形質転換体のコロニーを10mlのYPGal液体培地に1白金耳植菌し、30℃で24時間培養した。適当に希釈したあとYPGalプレートに塗付し30℃で2日間培養した。得られたコロニーを任意に100株選択し、1  $\mu$ g/mlのシクロヘキシミドを含むYPD寒天培地にレプリカしてシクロヘキシミド耐性を調べた。

その結果、100株中100株がシクロヘキシミドを含む寒天培地では生育できず、これらの株では部位特異的組換えにより選択マーカー遺伝子が切り出されたと考えられる。

## (3-2) 2回目の形質転換と選択マーカー遺伝子の除去

上記操作によって得られた形質転換後に選択マーカー遺伝子が除去された株から1株をもとに、2回目の形質転換を行った。形質転換および選択マーカー遺伝子の除去操作は1回目と同様に行った。

【0074】

その結果、100株中100株がシクロヘキシミドを含む寒天培地では生育できず、これらの株では部位特異的組換えにより選択マーカー遺伝子が切り出されたと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

野生型FRT配列を含むプラスミドpPUFRT1-101の構築を示す概略図である。

【図2】

プラスミドpPUFRT3-103の構築を示す概略図である。

【図3】

実施例1で作製したDNA構成物に用いた1対のFRT配列とこれから組換えによって生じる再構成された配列を示す。

【図4】

プラスミドpPUGINFRT3-103の構築を示す概略図である。

【図5】

プラスミドpPPGINFRT3の構築を示す概略図である。

【図6】

本発明のDNA構成物を用いた部位特異的組換えによる選択マーカー遺伝子の除去を示す概略図である。

【図7】

選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から見て外側にあたる数個の塩基がそれぞれ欠失した1対のFRT配列を用いることにより、組換え後に残存する配列がFLP遺伝子産物により認識されにくい配列となることを示す概略図である。

【配列表】

<110> サントリー株式会社

<120> 酵母の育種方法

<130> 991618

<160> 28

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gaagttccta tactttctag agaataggaa cttc 34

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gaagttccta tactttctag agaataggaa c 31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gttcctatac tttctagaga ataggaactt c 31

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gttcctatac tttctagaga ataggaac 28

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gaagttccta tactttctag agaatagga 29

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ttcctatact ttctagagaa taggaacttc 30

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ttcctatact ttctagagaa tagga 25

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gaagttccta tactttctag agaatag 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ctatactttc tagagaatag gaacttc 27

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ctatactttc tagagaatag 20

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

tcgacgaagt tcctatactt tctagagaat aggaacttcg 40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

aattcgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttcg 40

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

agcttgaagt tcctatactt tctagagaat aggaacttcg catg 44

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttca 36

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ctagagaata ggaacg 16

<210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

aattcgttcc tattct 16

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

agcttggtcc tatacttt 18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

ctagaaagta taggaaca 18

<210> 19

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ctagagaata ggag 14

<210> 20

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

aattctccta ttct 14

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<400> 21

agctttccta tacttt 16

<210> 22

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ctagaaagta taggaa 16

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

ctagagaata gg 12

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

aattcctatt ct 12

<210> 25

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

agcttctata cttt 14

<210> 26

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

ctagaaagta taga 14

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

tggatccgga atttcgacgg atcaataac 29

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

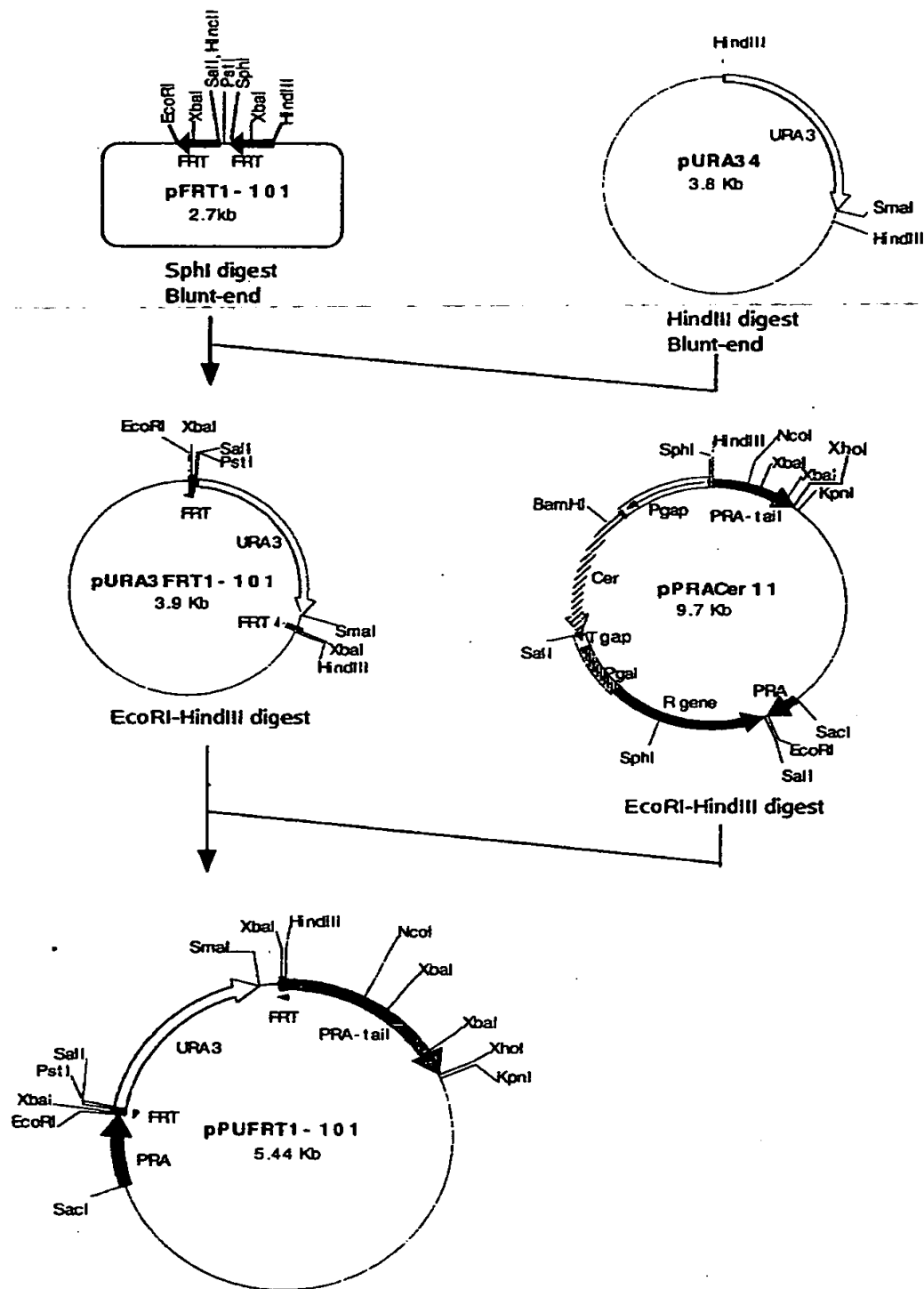
<213> Artificial Sequence

<400> 28

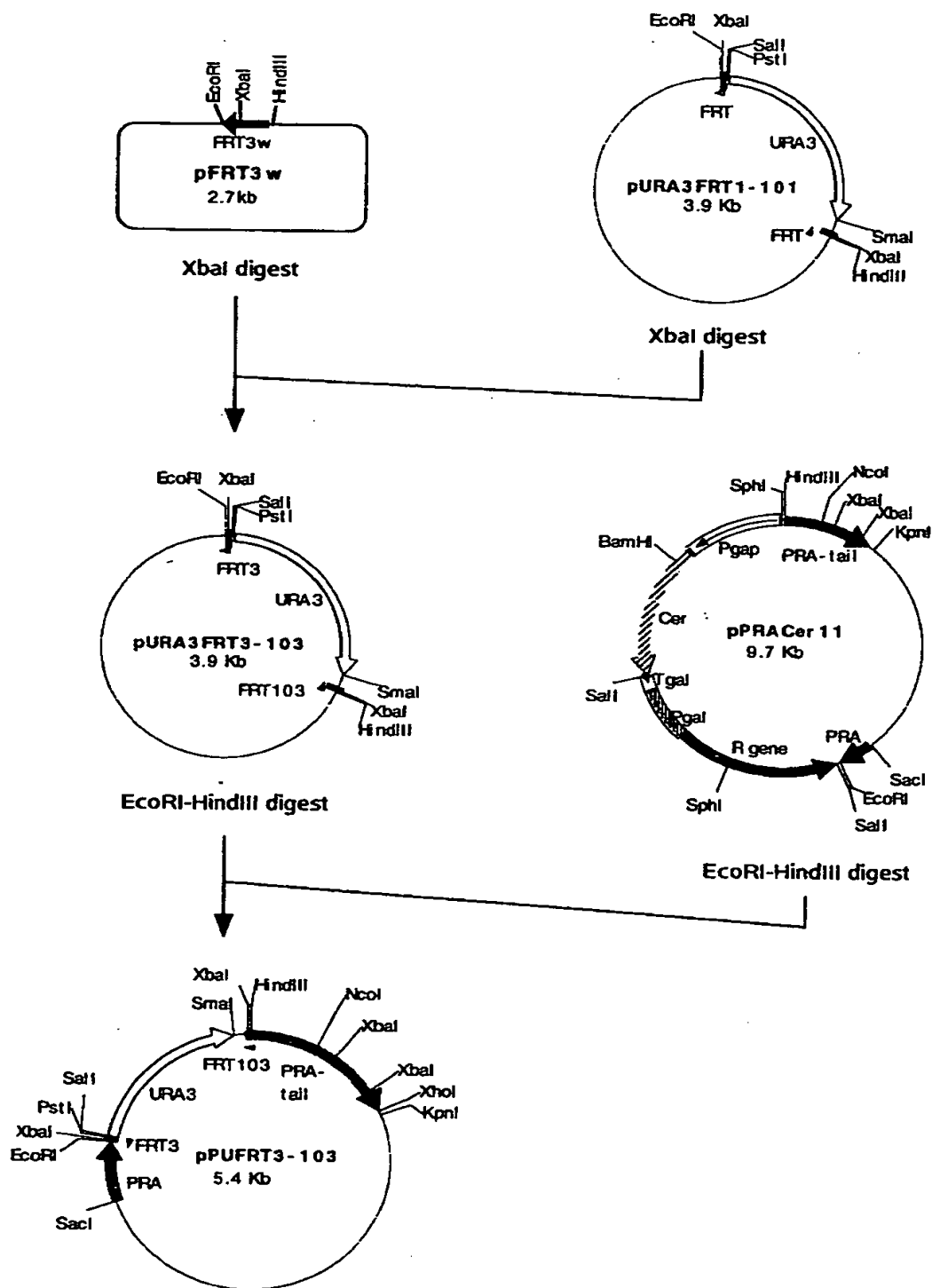
ttctgcagac tagatgcact catatcatta tgcac 35

【書類名】 図面

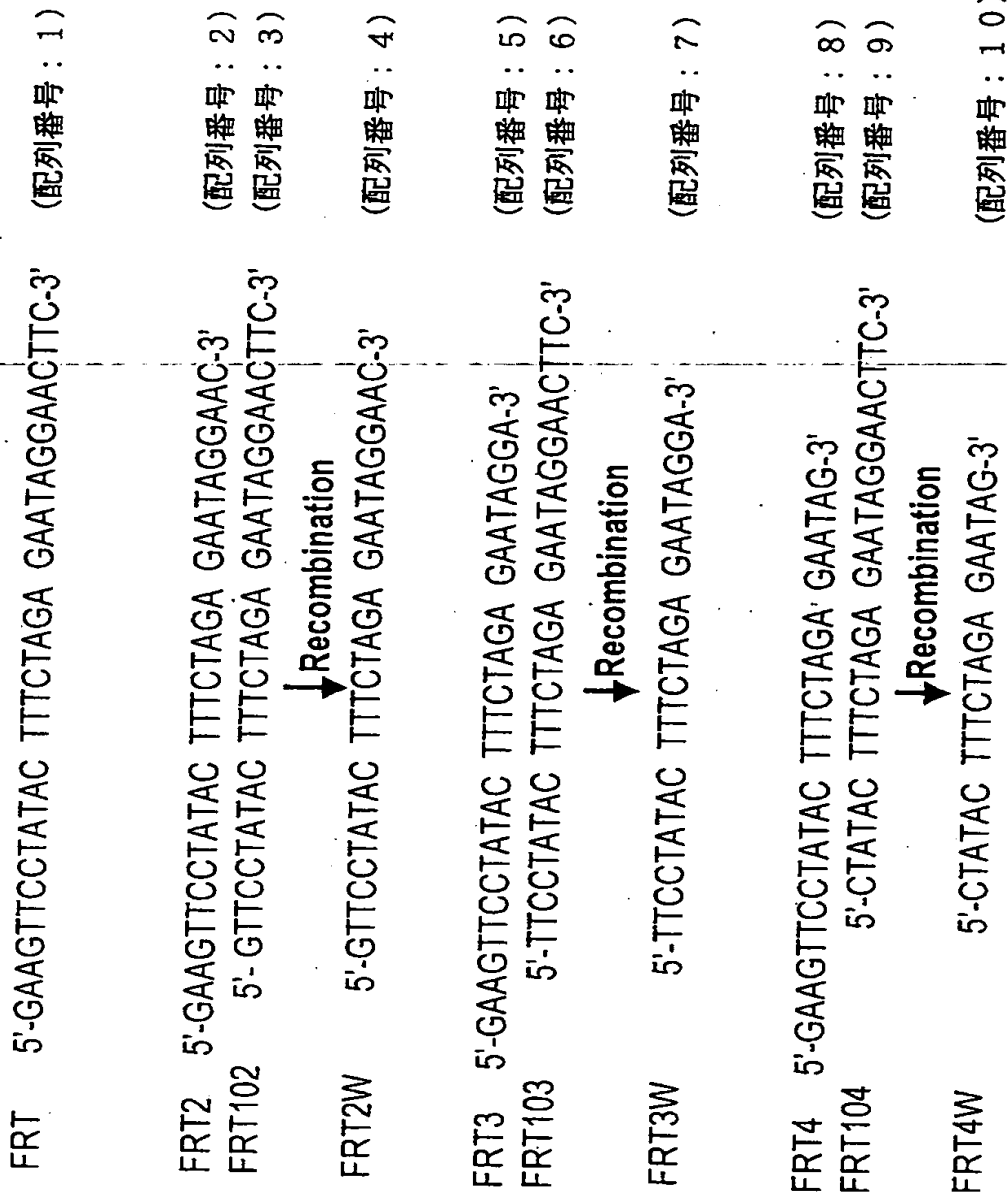
【図 1】



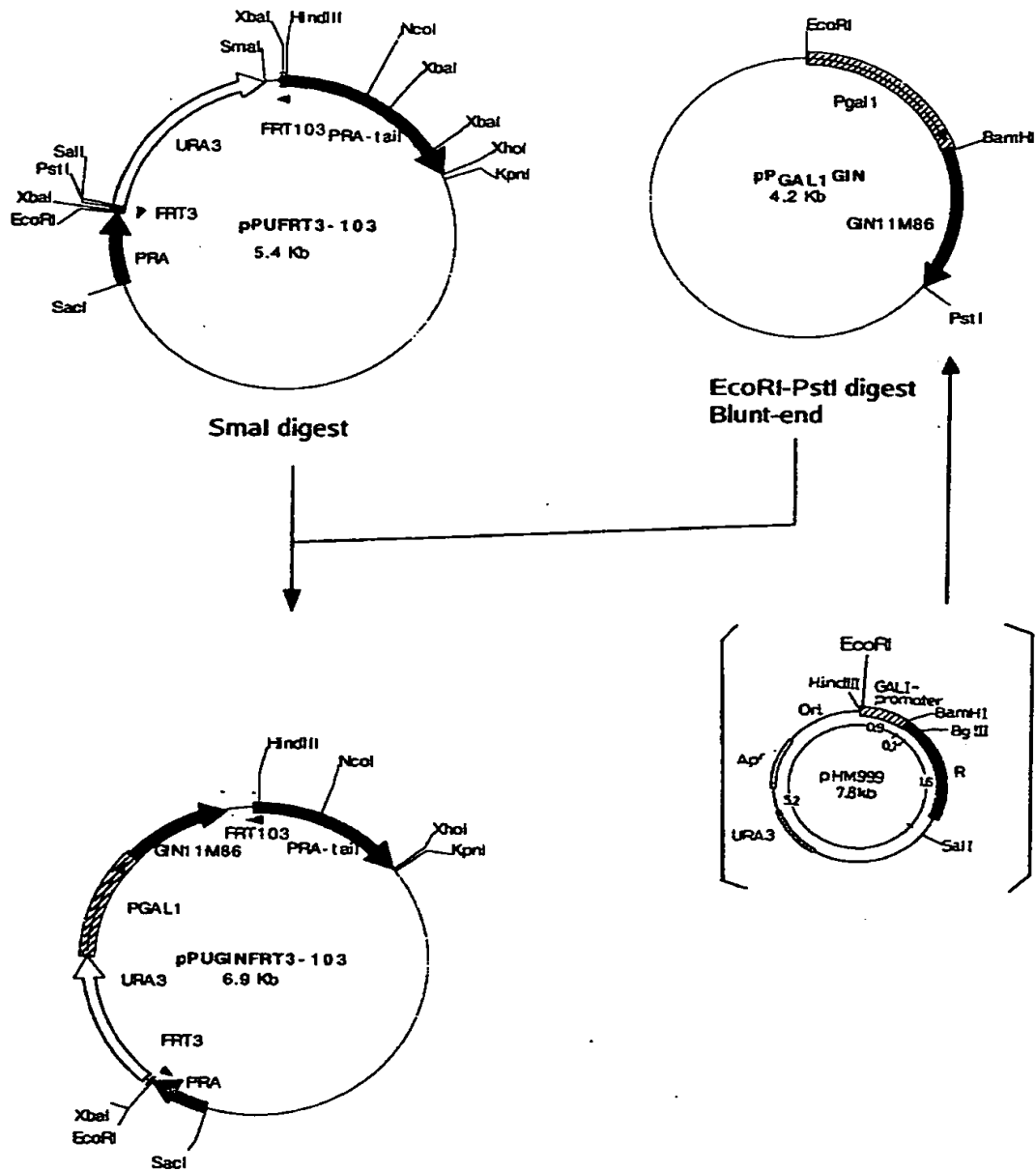
【図 2】



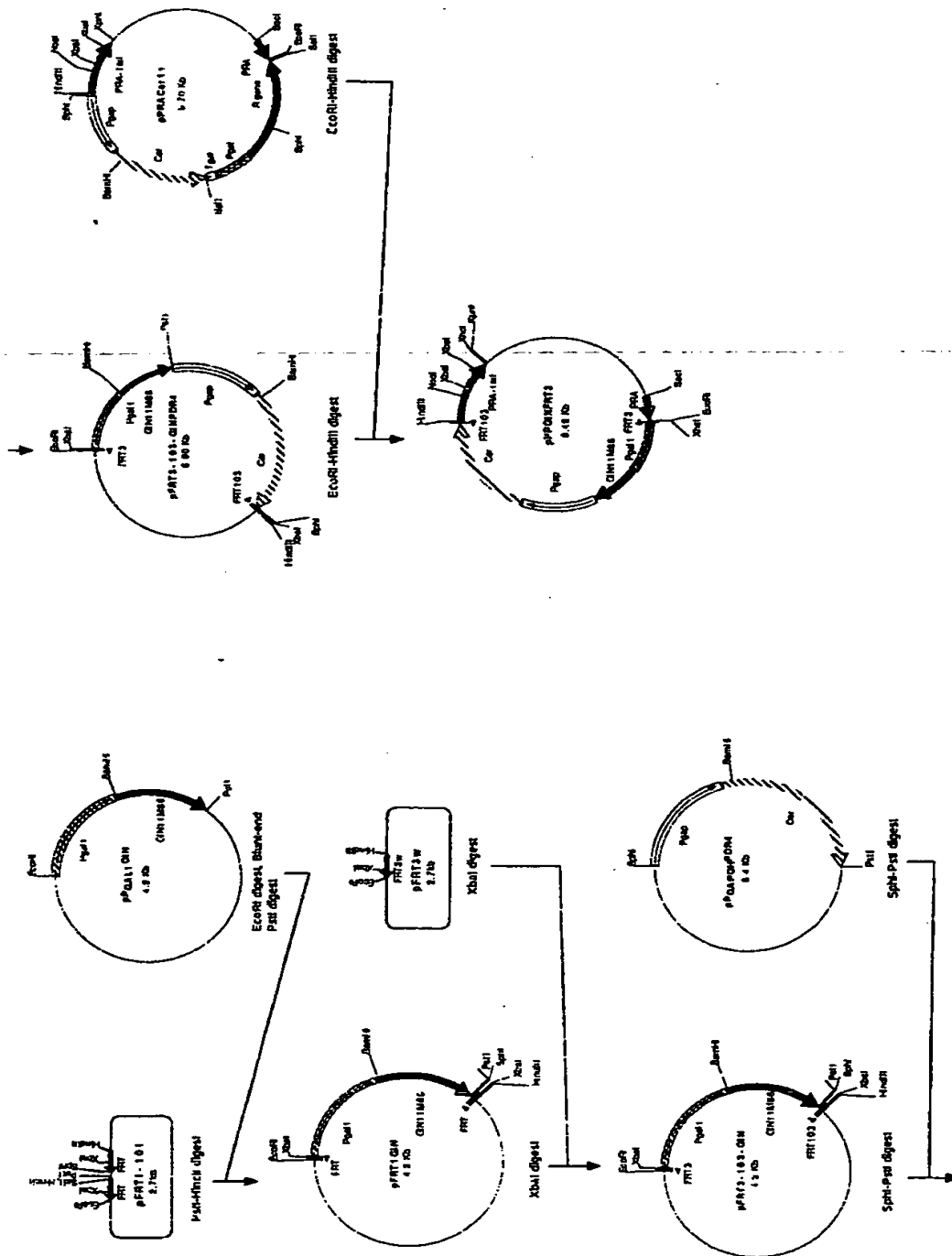
【图 3】



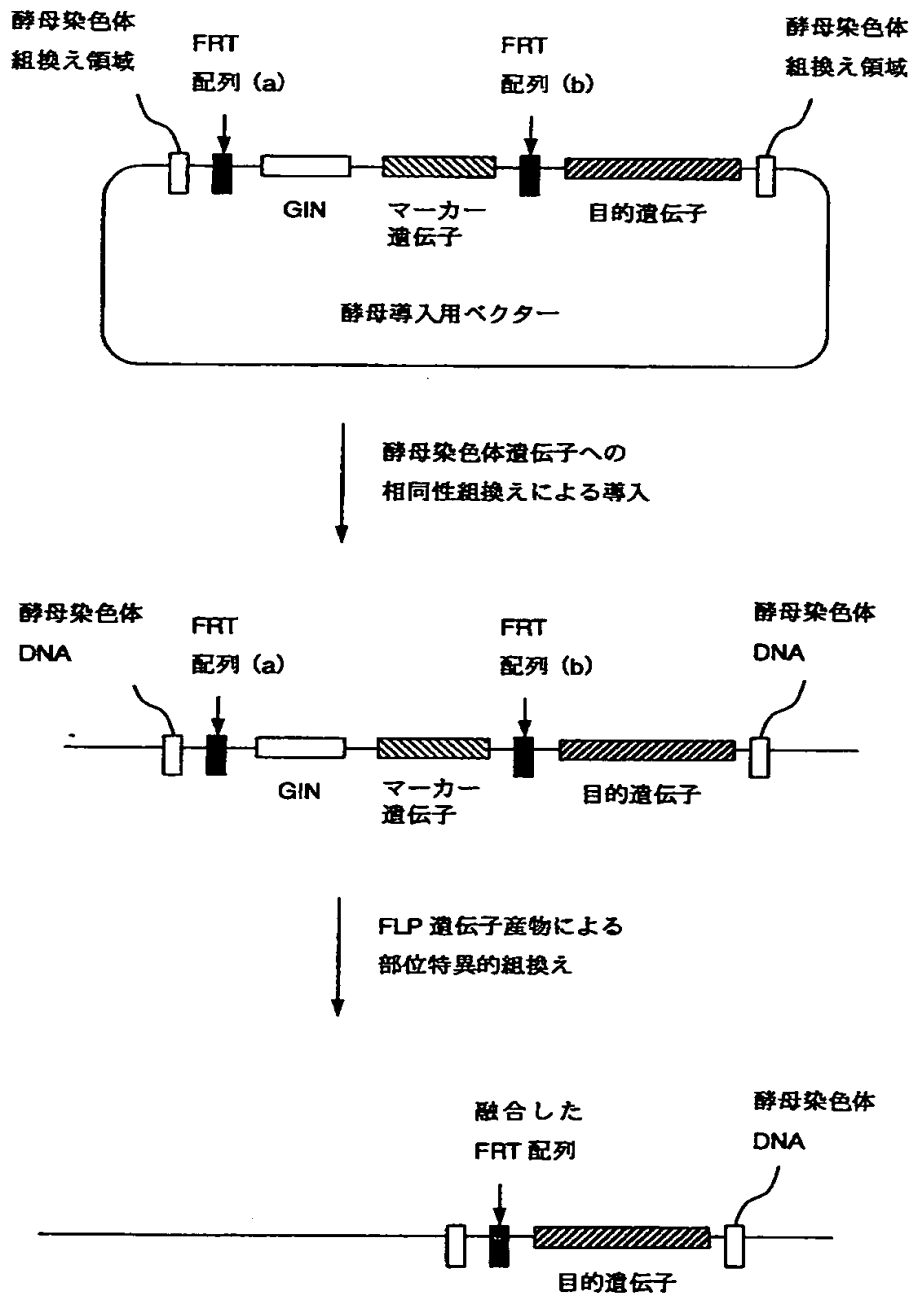
【図 4】



【図 5】

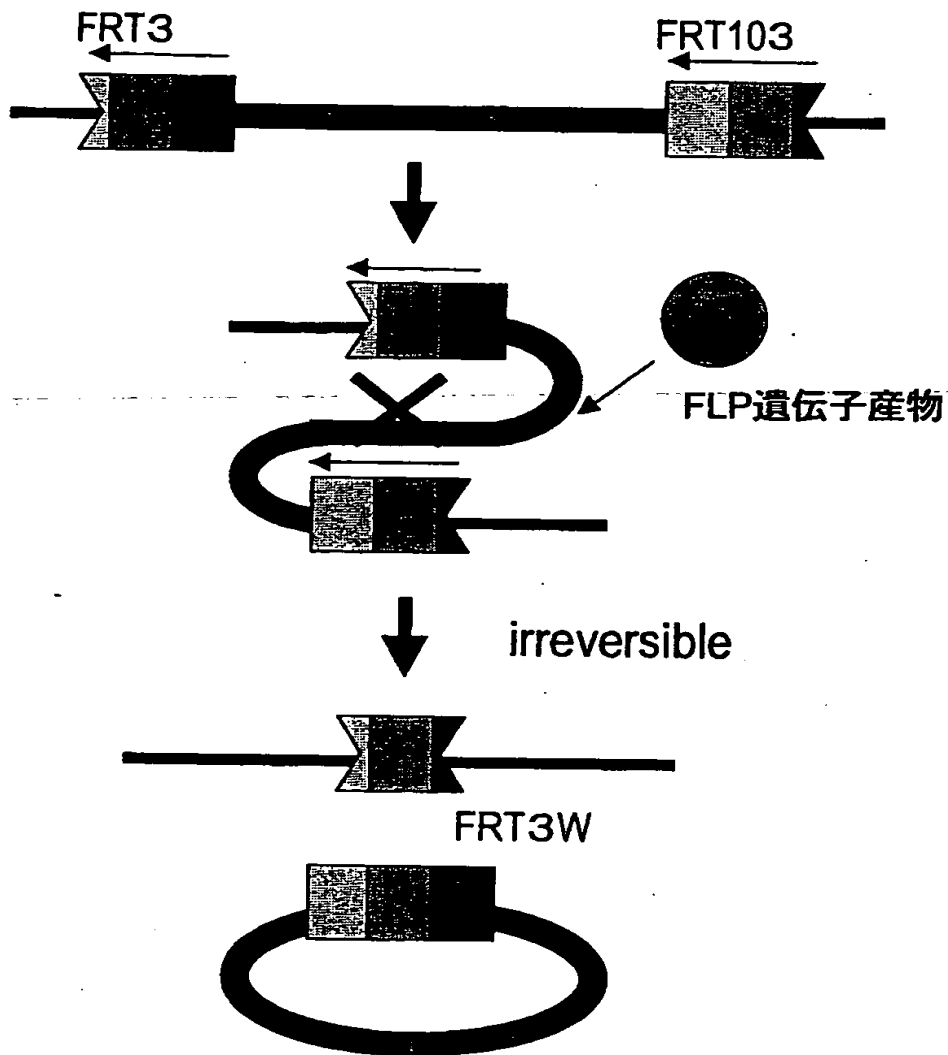


【図 6】





【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 選択マーカー遺伝子を有さず、かつ望ましい目的遺伝子を効率よく発現する形質転換体を作製する方法を提供する。

【解決手段】

- (1) 選択マーカー遺伝子、
  - (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、
  - (3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び
  - (4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片、
- からなる DNA 構成物であって、該 FRT 配列が次の配列：

【化 1】

5' - GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC - 3' (配列番号：1)

逆向き反復	スペーサー	逆向き反復
配列 (1)	配列	配列 (2)

を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失していることを特徴とする DNA 構成物、及びこれを用いるサッカロマイセス属酵母の形質転換方法、該方法で形質転換されたサッカロマイセス属酵母、ならびに該サッカロマイセス属酵母を用いることを特徴とするビールの製造方法。

【選択図】 図 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

---

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
氏 名 サントリー株式会社

